

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.05.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 5月 8日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-132995

[ST.10/C]:

[JP2002-132995]

出 願 人

Applicant(s):

アークレイ株式会社

REC'D 27 JUN 2003

WIPO

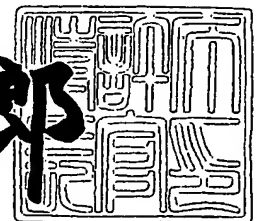
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3045720

【書類名】	特許願
【整理番号】	P-9659
【提出日】	平成14年 5月 8日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 15/09
【発明の名称】	標的核酸の検出法
【請求項の数】	5
【発明者】	
【住所又は居所】	京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式 会社内
【氏名】	猪瀬 健
【特許出願人】	
【識別番号】	000141897
【氏名又は名称】	アークレイ株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100089244
【弁理士】	
【氏名又は名称】	遠山 勉
【選任した代理人】	
【識別番号】	100090516
【弁理士】	
【氏名又は名称】	松倉 秀実
【選任した代理人】	
【識別番号】	100100549
【弁理士】	
【氏名又は名称】	川口 嘉之
【連絡先】	0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標的核酸の検出法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法であって、下記ステップを含む方法：

(a) 前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第 1 のプローブと、第 1 のプローブの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第 1 の領域と、第 1 のプローブに相補的な配列を有さないループ領域と、第 1 のプローブの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第 2 の領域とを有し、第 1 のプローブとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第 2 のプローブと、試料とを、第 1 のプローブと第 2 のプローブ、及び第 1 のプローブと標的核酸とがアニールする条件で試料と混合し、

(b) 前記標識物質の信号を検出する。

【請求項 2】 第 2 のプローブの第 2 の領域は、第 1 のプローブの特異的領域よりも短いことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記標識物質が、各々ループ領域を挟んで配置された蛍光物質と、この蛍光物質の近傍にあると蛍光物質の蛍光を消光するクエンチャーであり、第 1 のプローブと第 2 のプローブがアニールしてループが形成されているときは蛍光物質の蛍光はクエンチャーにより消光され、第 1 のプローブが第 2 のプローブとアニールしていないときは前記蛍光はアニールしているときと比べて消光されないことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記信号の検出を定量的に行い、それによって標的核酸を定量することを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出するためのキットであって、

前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第 1 のプローブと

、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の配列とを有し、第1のプロープとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第2のプロープとを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法及びキットに関する。本発明の方法及びキットは、標的核酸をリアルタイムに検出することができ、生化学等の分野で有用である。

【0002】

【従来技術】

試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法として、プロープを用いたハイブリダイゼーション法、及び、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR法等が用いられている。また、PCR法は、標的核酸の検出やクローニング等、様々な分野で汎用されており、種々の改良法が開発されている。

【0003】

PCR法において、標的配列の増幅と増幅産物の分析を同時に行う、いわゆるリアルタイムPCRが知られている。増幅産物を分析する手段としては、例えば、Taq-Manプロープ法（米国特許第5,210,015号、特表平6-500021号、Holland et al., Pro. Natl. Aca. Sci. USA., 88, 7276-7280, 1991）、モレキュラービーコン法（特開平5-123195号、Sanjay Tyagi et al., Nature Biotechnology, vol 14, March 1996）、及びインターカラーター法（Bio/Technology, 10, 413-417, 1992、Bio/Technology, 11, 1026-1030, 1993、特開平5-237000号）等が知られている。

【0004】

Taq-Manプロープ法では、蛍光物質と、この蛍光物質が発する蛍光を消光する

クエンチャーで標識されたプローブが用いられる。このプローブは、標的核酸にハイブリダイズしているときは、蛍光はクエンチャーにより消光されるが、PCRに用いられるポリメラーゼの5'→3'エキソヌクラーゼ活性により増幅反応時に切断される。その結果、クエンチャーから蛍光物質が遊離して、蛍光を発する。この蛍光によって、二本鎖DNA分子の量を知ることができる。

【0005】

また、モレキュラービーコン法は、標的配列に相補的な配列と、その両側に互いに相補的な配列を有するアームからなり、両端に蛍光物質とクエンチャーが結合したプローブを用いる方法である。このプローブは、標的核酸にアニールしているときは、蛍光物質は蛍光を発するが、標的核酸から解離すると、アームを形成することにより蛍光物質とクエンチャーが接近して消光される。

【0006】

一方、インターカレーター法は、エチジウムブロマイド等のインターカレーターを用いて、二本鎖DNAを検出する方法である。

上記のように、リアルタイムにPCR増幅産物を定量する方法が知られているが、Taq-Manプローブ法は、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を持たないポリメラーゼを用いる増幅法の場合は適用することができず、モレキュラービーコン法は、プローブの設計が困難であり、また、分子内結合の為検出効率が悪く、インターカレーター法は、配列の特異性がないという問題がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記観点からなされたものであり、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を持つポリメラーゼを使用しなくても、標的核酸をリアルタイムに、かつ、簡便に定量する方法及びキットを提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、長短二種類のプローブを用いることにより、標的核酸を簡便に定量することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

【0009】

(1) 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法であって、下記ステップを含む方法：

(a) 前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプロープと、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の領域とを有し、第1のプロープとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第2のプロープと、試料とを、第1のプロープと第2のプロープ、及び第1のプロープと標的核酸とがアニールする条件で試料と混合し、

(b) 前記標識物質の信号を検出する。

(2) 第2のプロープの第2の領域は、第1のプロープの特異的領域よりも短いことを特徴とする(1)の方法。

(3) 前記標識物質が、各々ループ領域を挟んで配置された蛍光物質と、この蛍光物質の近傍にあると蛍光物質の蛍光を消光するクエンチャーであり、第1のプロープと第2のプロープがアニールしてループが形成されているときは蛍光物質の蛍光はクエンチャーにより消光され、第1のプロープが第2のプロープとアニールしていないときは前記蛍光はアニールしているときと比べて消光されないことを特徴とする(1)又は(2)の方法。

(4) 前記信号の検出を定量的に行い、それによって標的核酸を定量することを特徴とする(1)～(3)のいずれかの方法。

(5) 試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出するためのキットであって、前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプロープと、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領

域の少なくとも一部に相補的な第2の配列とを有し、第1のプローブとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる第2のプローブとを含むキット。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の方法は、試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する方法である。標的核酸は、標的配列を有するものであれば特に制限されず、DNAであってもRNAでもよく、また、一本鎖でも二本鎖でもよい。本発明は、特に二本鎖DNAの検出に好適に適用される。本発明の好ましい形態においては、標的核酸は定量的に検出される。尚、定量的な検出とは、核酸の絶対量を測定すること、及び、核酸の量のある量に対して相対的に測定することを含む。

【0011】

標的配列は、通常、標的核酸に特異的な配列であり、この配列に相補的な配列を有するプローブと特異的なハイブリッドを形成し得るものであれば、配列及び長さは特に制限されない。標的配列の長さは、好ましくは6塩基以上、より好ましくは15塩基以上である。

【0012】

標的核酸を含む試料としては、特に制限されないが、細胞、組織から抽出した核酸又は核酸混合物、又はこのような核酸又は核酸混合物を鋳型とするPCR核酸増幅反応液が挙げられる。

【0013】

本発明では、標的核酸の検出に2種類のプローブが用いられる（図1参照）。第1のプローブ（以下、「プローブ1」ともいう）は、標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる（図1A）。このような構造から、プローブ1は、標的核酸にハイブリダイズしたときに、非特異的領域は、一本鎖のままフラップを形成する（図1B）。非特異的領域の長さは、好ましくは10塩基以上、よ

り好ましくは10～30塩基である。

【0014】

第2のプローブ（以下、「プローブ2」ともいう）は、前記プローブ1の非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、プローブ1に相補的な配列を有さないループ領域と、プローブ1の特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の領域とを有し、プローブ1とアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識された核酸からなる（図1A）。

尚、図1には、5'側に特異的領域を、3'側に非特異的領域を有するプローブ1と、第1の領域、ループ領域及び第2の領域を5'側から順に有するプローブ2の例が示されている。本発明においては、プローブ1は3'側に特異的領域を、5'側に非特異的領域を有し、プローブ2は第1の領域、ループ領域及び第2の領域を3'側から順に有していてもよい。

【0015】

第1の領域は、プローブ1の非特異的領域の少なくとも一部に相補的な配列を有し、好ましくは、非特異的領域の全体に相補的な配列を有する。一方、第2の領域は、プローブ1の特異的領域の少なくとも一部に相補的な配列を有し、好ましくは特異的領域よりも短い。第2の領域を特異的領域よりも短くすることによって、プローブ1は、プローブ2よりも、標的核酸に優先的にアニールすることができる。第2の領域の長さは、好ましくは6塩基以上、より好ましくは6～20塩基である。あるいは、第2の領域は、特異的領域よりも、好ましくは1塩基以上、より好ましくは4塩基以上短くすることが望ましい。

【0016】

ループ領域は、プローブ1と相補的な配列を有さない領域であり、好ましくは標的核酸とも相補的な配列を有さない。ループ領域は、プローブ2がプローブ1に結合しているときはループ状の突出部を形成するが、プローブ2とプローブ1が解離すると、ループ構造は解消される（図1C）。プローブ2は、ループの形成を検出可能な信号を発する標識物質で標識される。標識物質は、具体的には例えば、各々ループ領域を挟んで配置されるエネルギー供与体とエネルギー受容体

からなる。エネルギー供与体及びエネルギー受容体は、例えば、蛍光物質と、この蛍光物質が発する蛍光を消光するクエンチャーが挙げられる。クエンチャーは、蛍光物質の近傍にあると蛍光を消光するが、蛍光物質との距離が一定以上になると消光しなくなる。このような蛍光物質及びクエンチャーを用いると、プローブ1とプローブ2がアニールしてループが形成されているときは蛍光物質の蛍光はクエンチャーにより消光され、プローブ1がプローブ2とアニールしていないときは蛍光は消光されない。したがって、蛍光物質からの蛍光を測定することにより、ループの形成、すなわちプローブ1とプローブ2とのハイブリダイゼーションの状態を検出することができる。蛍光物質としては、例えばフルオロセイン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 等のフルオレセイン系の色素等を、クエンチャーとしては例えばテトラメチルローダミンイソチオシアネイト (TRITC)、スルフォローダミン101の塩化スルホン酸誘導体(商品名：テキサスレッド)等のローダミン系の色素等が挙げられる。これらのうち、好ましい組合せは、FITCとテキサスレッドである。これらの標識物質は、これらの標識物質が結合したオリゴヌクレオチドを用いてプローブ2の化学合成を行うことにより、配列中の任意の部位に導入することができる。蛍光物質及びクエンチャーは、どちらが5' 側にあってもよい。

【0017】

ループ領域の配列及び長さは、プローブ1とプローブ2がアニールしたときにループ構造が形成され、ループ構造が形成されたときと解消されたときとで標識物質からの信号が異なるものであれば特に制限されない。尚、ループ領域は、ループ領域がプローブ2の第1の領域及び第2の領域と部分二本鎖を形成せず、かつ、ループ領域内で部分二本鎖を形成しないように設計することが好ましい。ループ領域の長さは、好ましくは10塩基以上、より好ましくは20塩基以上である。標識物質は、通常、ループ領域の両末端塩基から3塩基内、好ましくは両末端塩基に結合していることが望ましい。

【0018】

上記のようなプローブ1、プローブ2及び試料とを、プローブ1とプローブ2、及びプローブ1と標的核酸とがアニールする条件で混合する。但し、前記のよ

うな各プローブの構造から、プローブ1は、プローブ2よりも、標的核酸と優先的にアニールする。混合の順序は特に問わず、例えば、プローブ1とプローブ2を混合した後、試料を加える。また、プローブ1とプローブ2を予め混合したものを用意しておいてもよい。また、プローブ1及び又は試料を含まない反応液をコントロールとして用いることが好ましい。

【0019】

プローブ1とプローブ2は、好ましくは1:1のモル比で混合される。プローブ1とプローブ2の最終的な反応液中の濃度は、各々好ましくは0.1 μ M以上である。

【0020】

プローブ1、プローブ2及び試料を混合した後は、そのままプローブ1とプローブ2、及びプローブ1と標的核酸とがアニールする条件に置いてもよいし、一旦熱変性処理を行った後、前記条件に置いてもよい。

【0021】

上記反応液を、一定時間経過後、好ましくは平衡状態状態に達した後に、標識物質の信号を検出する。より好ましくは、信号の検出は経時的に行う。前記条件は、例えば、プローブ1とプローブ2の T_m より3~10℃低い温度が挙げられる。最適な条件は、何段階か温度を変えて、信号の検出を経時的に行い、コントロールとの差異が最も明確になる条件を選択することにより、容易に決定することができる。蛍光物質としてFITCを、クエンチャーとしてテキサスレッドを用いた場合、信号の検出は、FITCに由来する蛍光波長515nmの蛍光強度を測定することにより行われる。蛍光強度の測定は、市販の装置を用いて測定することができる。測定結果を図2及び図3に例示する。これらの結果については、実施例において詳述する。

【0022】

標識物質の信号の検出を定量的に行うことによって、標的核酸の量を定量することができる。

本発明のキットは、上記標的核酸を検出するために用いられるものであり、プローブ1及びプローブ2を含むキットである。各プローブは、溶液であっても、

凍結乾燥品であってもよい。また、各プローブは、各々別の容器に入れられていてもよいし、同一の容器に混合物として入れられていてもよい。本発明のキットは、さらに、各プローブ又は試料を溶解又は希釈するための緩衝液を含んでいてもよい。

【0023】

本発明の方法及びキットは、核酸増幅反応液中の増幅産物のリアルタイムな定量に好適に用いることができる。本発明のキットは、このような標的核酸を核酸増幅法により増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを含んでいてもよい。このプライマーは、各プローブとは別個の容器に入れられる。

【0024】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

プローブ1（配列番号1）、プローブ2（配列番号2）、及び標的オリゴヌクレオチド（配列番号3）を合成した。各オリゴヌクレオチドの合成は、株式会社日本バイオサービスに依頼した。プローブ2の塩基番号21のヌクレオチド（T）はFITCで、塩基番号52のヌクレオチド（T）はテキサスレッドで各々標識されている。尚、標的オリゴヌクレオチドは、ヒトアミリン遺伝子の部分配列である。

【0025】

プローブ1の塩基番号1～28は、標的オリゴヌクレオチドの塩基番号6～33に相補的である。また、プローブ1の塩基番号11～33、及び塩基番号35～55は、プローブ2の塩基番号52～74及び塩基番号1～21に、それぞれ相補的である。尚、配列番号2の塩基番号57～74は、配列番号3の6～23と相同である。

【0026】

各オリゴヌクレオチドは、TE緩衝液に5 μ Mとなるように溶解した。1.5mlチューブに、10 \times Ex Taq buffer（宝酒造（株） Lot. A6501-1）2.2 μ l、滅菌蒸留水 19.8 μ l、プローブ2溶液（5 μ M）1 μ lを加え、よく混合し、反応機（Cepheid社 Smart Cycler）用の25 μ l容チューブに23 μ lづつ分注した。各チューブに、

プローブ1溶液 (5 μ M) 又はTE緩衝液 1 μ lを加え、さらに、標的オリゴヌクレオチド溶液 (5 μ M) 又はTE緩衝液 1 μ lを加え、反応液を得た。この操作は、室温で行った。

【0027】

上記反応液、又は上記反応液を94℃で3分加熱処理したものをSmart Cyclerにセットし、47℃に調整し、波長505～537nmの蛍光を測定した。加熱処理しない反応液の結果を図1に、加熱処理したものの結果を図2に示す。

プローブ2のみでは蛍光が認められたが、プローブ1を加えた場合は、著しく消光された。プローブ2に、プローブ1とともに標的オリゴヌクレオチドを加えた場合は、その中間の強度の蛍光が観察された。この結果は、加熱処理の有無に関わらず、同様であった。

【0028】

以上のように、標的配列が存在しない場合に比べて、標的配列が存在すると高い強度の蛍光が観察されたことから、プローブ1はプローブ2よりも標的配列に優先的に結合し、プローブ2の一部は遊離していることが確かめられた。

【0029】

【発明の効果】

本発明により、標的核酸をリアルタイムに、かつ、簡便に定量することができる。本発明の方法は、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を持つポリメラーゼを必要としないので、種々の反応系に適用することができる。

【0030】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Arkray, Inc.

<120> A method for detecting a target nucleic acid (標的核酸の検出法)

<130> P-9659

<140>

<141> 2002-05-08

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 3 1 】

<210> 1

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe 1

<400> 1

aaagttgttg ctggaatgaa ctaaaaaatg gcaatattca catgtacagg actcag 56

【 0 0 3 2 】

<210> 2

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe 2

<400> 2

ctgagtccag tacaactgaa taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa attgccattt 60

tttagttcat tccag

75

【 0 0 3 3 】

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: target oligonucleotide

<400> 3

ggcaaatttt ttagttcatt ccagcaacaa ctttggtgcc attctctcat 50

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の概念を示す概略図。F は蛍光物質を、Q はクエンチャーを表す。

【図 2】 反応液の蛍光強度の経時的変化を示すグラフ図（加熱処理しないもの）。

実線：プローブ 1 + プローブ 2 + 標的オリゴヌクレオチド

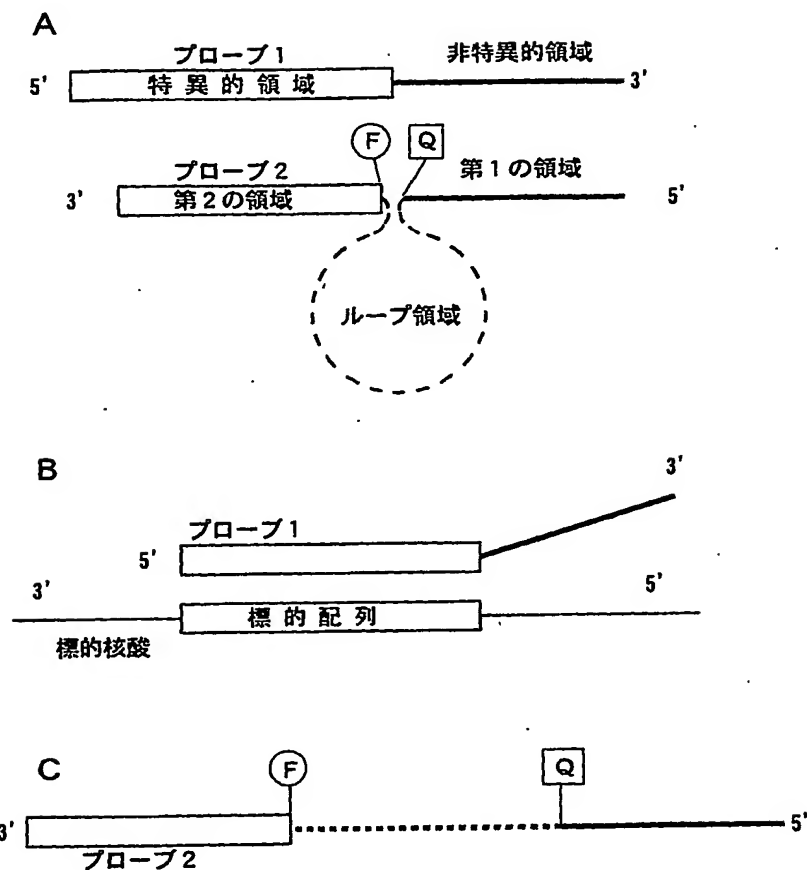
点線：プローブ 1 + プローブ 2

一点鎖線：プローブ 2

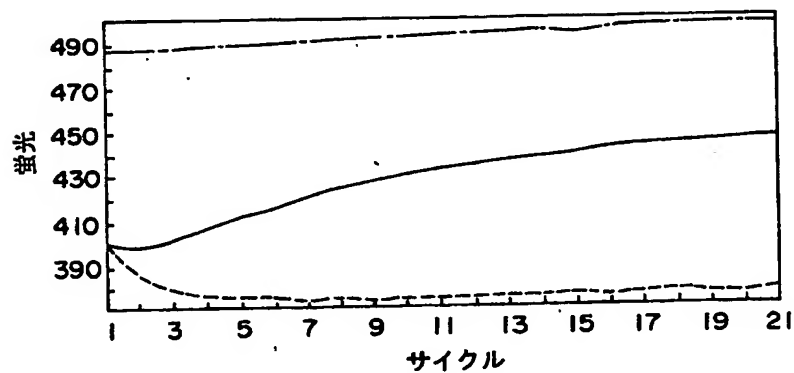
【図 3】 反応液の蛍光強度の経時的変化を示すグラフ図（加熱処理したもの）。

【書類名】 図面

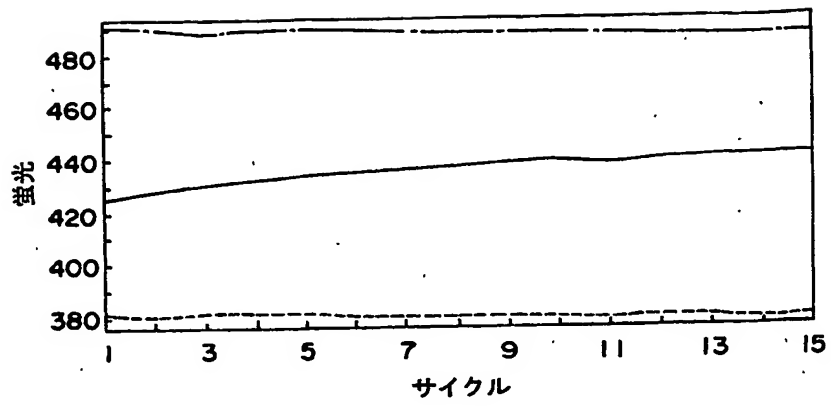
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標的核酸をリアルタイムに、かつ、簡便に定量する方法及びキットを提供する。

【解決手段】 下記ステップにより、試料中の、標的配列を有する標的核酸を検出する。

(a) 前記標的配列に相補的な配列を有する特異的領域と、標的核酸の標的配列に相補的でない配列を有する非特異的領域とを有する核酸からなる第1のプロープと、第1のプロープの非特異的領域の少なくとも一部に相補的な第1の領域と、第1のプロープに相補的な配列を有さないループ領域と、第1のプロープの特異的領域の少なくとも一部に相補的な第2の配列とを有し、第1のプロープとアニールさせたときにループ領域がループを形成することができ、かつ、前記ループの形成を検出可能な標識物質で標識された核酸からなる第2のプロープと、試料とを、第1のプロープと第2のプロープ、及び第1のプロープと標的配列とがアニールする条件で試料と混合し、

(b) 第1のプロープと第2のプロープにより形成されるループを検出する。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日	2000年 6月12日
[変更理由]	名称変更
住 所	京都府京都市南区東九条西明田町57番地
氏 名	アークレイ株式会社